褐飞虱成虫唾液细菌蛋白的鉴定

苗雨桐, 邓　瑶, 刘玉娣*, 侯茂林

(中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193)

摘要:【目的】通过鉴定褐飞虱 *Nilaparvata lugens* (Stål)水状唾液中的细菌蛋白,了解其唾液中的细菌种类。【方法】利用双层膜夹蔗糖溶液的方法对褐飞虱成虫唾液进行收集,超滤浓缩后进行电泳,然后利用液相色谱-电喷雾串联质谱(LC-ESI-MS/MS)方法鉴定蛋白,与 Uniprot 的细菌蛋白数据库进行比对从而鉴定褐飞虱成虫唾液中的细菌蛋白。【结果】在褐飞虱成虫唾液中鉴定到 22 种细菌的 35 种蛋白,这些蛋白主要参与能量代谢过程、蛋白的折叠和合成以及氨基酸代谢过程。这些细菌分布在变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)和厚壁菌门(Firmicutes)3 个门。蛋白种类较多来源于变形菌门。【结论】鉴定到蛋白的这些细菌可能在褐飞虱的生活史中扮演重要角色。

关键词: 褐飞虱; 唾液; 细菌蛋白; 共生菌; LC-ESI-MS/MS

中图分类号: Q966　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 0454-6296(2017)07-0772-10

Identification of bacterial proteins in saliva of adults of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae)

MIAO Yu-Tong, DENG Yao, LIU Yu-Di*, HOU Mao-Lin (State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract:【Aim】To understand the bacteria species in saliva of adults of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*, by identifying the bacterial proteins in their saliva.【Methods】Saliva of *N. lugens* adults was collected by stretching two layers of Parafilm with sucrose diet. Protein solution was subjected to electrophoresis after concentration by ultrafiltration. Protein identification was conducted by liquid chromatography-electrospray ionisation-tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS) analysis, and the spectra were searched against the Uniprot database of bacterial protein to identify the bacterial proteins in saliva.【Results】Thirty five proteins of twenty-two species of bacteria, mainly related to energy metabolism, protein folding and synthesis and amino acid metabolism, were identified in saliva of *N. lugens* adults. These bacteria belong to Proteobacteria, Actinobacteria and Firmicutes, and most are from Proteobacteria.【Conclusion】The endosymbiont bacteria in *N. lugens*, whose proteins were identified, may play an important role in the life history of this insect.

Key words: *Nilaparvata lugens*; saliva; bacterial protein; endosymbiont bacteria; LC-ESI-MS/MS

内共生菌与昆虫具有互利关系,在昆虫的生长、生殖及传播植物病害上都具有重要意义(谭周进等, 2005)。尤其是对于刺吸式口器的昆虫,它们取食的营养物质有限,通常需要内共生菌提供生长发育所需的营养,而且共生菌在寄主环境耐受力及天敌防御能力等方面作用明显(张焱等, 2016)。刺吸式口器昆虫在刺吸木质部或韧皮部汁液的过程中,会分泌水状唾液和胶状唾液,胶状唾液主要形成口

基金项目: 国家自然科学基金项目(31370439)

作者简介: 苗雨桐, 女, 1992 年生, 河北怀来人, 硕士研究生, 研究方向为昆虫生化与分子生物学, E-mail: 980432330@qq.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: ydliu@ippcaas.cn

收稿日期 Received: 2017-02-14; 接收日期 Accepted: 2017-05-17

针鞘围绕并保护口针(Sharma *et al*., 2014),而水状唾液在昆虫与寄主的互作过程中可能发挥了重要的作用。张瑛等(2015)在斑透翅蝉 *Hyalessa maculaticollis*(Motschulsky)的唾液腺中鉴定出7种细菌,分别属于变形菌门(Proteobacteria)和厚壁菌门(Firmicutes)。Brumin 等(2012)在烟粉虱 *Bemisia tabaci* 的唾液腺中发现了立克次氏体 *Rickettsia*,表明这种细菌可能在昆虫之间发生了水平传递。

褐飞虱 *Nilaparvata lugens*(Stål)属半翅目(Hemiptera)飞虱科(Delphacidae)。它是亚洲水稻上最具破坏性的害虫之一,通过刺吸植物汁液和传播病毒病造成水稻上严重的经济损失(Sogawa, 1982)。已有研究表明,褐飞虱腹部脂肪体内存在真菌型的内共生菌类酵母共生菌(yeast-like symbiote, YLS),该菌与褐飞虱的营养需求有密切关系(王国超, 2005),但对于褐飞虱体内的细菌型共生菌种类仍未有定论。Tang 等(2010)在3个生物型的褐飞虱体内鉴定到18种细菌,包括已确定的褐飞虱共生菌 *Wolbachia*。李香香等(2011)在褐飞虱肠道中鉴定到13种细菌。王渭霞等(2010)在褐飞虱体内首次鉴定到杀雄菌属 *Arsenophnus* 的共生菌。唐明等(2014)收集了褐飞虱的水状唾液,通过建立16S rRNA 鉴定到6种细菌,种类较少,而且这6种细菌中包含2种固氮细菌和2种成团泛菌,可能来源于土壤或水稻本身。由于褐飞虱唾液在其取食和致害过程中起着重要的作用,共生细菌也与昆虫之间相互作用,本研究以褐飞虱成虫唾液的细菌蛋白为着手点,采用液相色谱-电喷雾串联质谱(liquid chromatography-electrospray ionisation-tandem mass spectrometry, LC-ESI-MS/MS)方法鉴定褐飞虱唾液中的细菌蛋白,为研究褐飞虱唾液细菌蛋白及其体内细菌在褐飞虱取食、致害过程中扮演的角色提供理论基础。

1　材料与方法

1.1　试虫饲养

实验所用褐飞虱采自广西桂林市兴安县的水稻 *Orvza sativa*(TN1品种)田中,用TN1水稻置于培养箱中饲养,饲养条件:温度27±1℃,相对湿度80%±10%,光周期16L∶8D。

1.2　试虫唾液收集

利用双层膜夹蔗糖溶液的方法对褐飞虱成虫唾液进行收集。用两层拉伸的Parafilm膜封住一端开口的圆柱形玻璃容器(直径5 cm,高8 cm),在两层膜中间的夹层中加入1 mL事先灭菌的15%的蔗糖溶液,容器底部事先倒入少量2%的琼脂保湿。在瓶内放入50头预先饥饿1 h的褐飞虱长翅型成虫,将瓶身用黑布包裹,瓶口处照光吸引褐飞虱取食蔗糖溶液。24 h后将收集到的蔗糖溶液吸出,保存至液氮中,共收集约8 000头褐飞虱水状唾液。

1.3　唾液样品超滤浓缩

取两个超滤管加入500 μL体积的离心超滤装置中。离心超滤加入罗氏蛋白酶抑制剂cocktail和还原剂二硫苏糖醇(DTT),防止离心后降解。在14 000×g离心力下离心,每次20 min。分批将褐飞虱唾液样品加入超滤管中,将超滤下的溶液从滤管中移除,加入样品使其达到上样超滤最大体积。再次离心,移除滤过液,直到将全部样品浓缩到200 μL体积。取出20 μL样品上样,聚丙烯酰胺凝胶电泳后,染色。

1.4　样品胶内酶解

将样品按照条带分布分成15个组分(图1)。在每个离心管内加入1 mL水,清洗10 min,将水移除,重复1次。在每个离心管中加入1 mL胶内消化脱色液,移除液体,加入乙腈(ACN)(Fisher Scientific公司)脱水至胶粒完全变白,真空抽干乙腈。加入10 mmol/L DTT(Promega公司),让胶粒吸收完全,放入56℃水浴锅内,孵育1 h。孵育完毕后移除多余DTT液体,加入55 mmol/L碘代乙酰胺(IAM)(Promega公司),暗室室温孵育1 h。孵育完毕后,移除多余IAM液体,加入25 mmol/L碳酸氢铵(NH_4HCO_3)清洗10 min,重复清洗1次。移除NH_4HCO_3,加入脱色液清洗10 min,重复1次。乙腈脱水至胶粒完全变白,真空抽干乙腈。1 μg/μL的酶储液以25 mmol/L NH_4HCO_3稀释15倍,加入脱水后的胶粒中,让胶粒充分吸收。然后加入25 mmol/L NH_4HCO_3没过胶粒,放入37℃水浴锅,消化过夜。过夜后,将液体转移至一新离心管中。用50 μL 50 mmol/L NH_4HCO_3,50 μL 0.1%的甲酸水溶液,50 μL 0.1%的甲酸乙腈溶液,50 μL乙腈进行肽段抽提。将所有的液体冻干,用0.1%甲酸复溶。

1.5　肽段的液相色谱-电喷雾串联质谱(LC-ESI-MS/MS)分析

分别将消化后的肽段溶液20 000×g离心15 min,取上清液10 μL上样,通过Dionex公司UltiMate3000型号的纳升液相色谱仪进行分离。所

用的柱子包括 Trap 柱和分析柱两部分。分离程序如下：先以 4 μL/min 的流速在 5 min 内将样品加入到 Trap 柱上，紧接着一个总流速为 400 μL/min 的分析梯度将样品带入分析柱，分离并传输至质谱系统。先在 5% 缓冲液 B（ACN，0.1% 甲酸）下洗脱 5 min，跟着一个 40 min 的线性梯度使缓冲液 B 的比例由 5% 上升至 30%，在接下来的 8 min 线性上升到 80%，然后缓冲液 B 在 80% 保持 8 min，最后在 2 min 内恢复至 5% 并在此条件下平衡 7 min。经过液相分离的肽段进入到串联 ESI 质谱仪：Q Exactive（Thermo Scientific 公司）。机器一级分辨率设置为 70 000（质荷比/半峰宽），二级为 17 500。挑选电荷为 2 + ~6 +，强度超过 500 的前 15 个离子进行二级检测，用碰撞能量为 28% 的高能诱导解离（higher-energy collisional dissociation，HCD）模式对肽段进行碎裂，碎片在 LTQ 中分析并检测信号。二级扫描范围是依赖于一级母离子质荷比自动选择。离子源电压设置为 1.8 kV。扫描的质荷比范围为一级 350 ~ 2 000，二级根据一级自动选择。质谱参数如表 1。

表 1　质谱分析参数

Table 1　Parameters of mass spectrum analysis

参数名称 Parameter description	参数值 Parameter values
离子模式 Ion mode	正离子模式 Positive ion mode
一级扫描范围 First level scanned area	350 – 2 000
一级扫描分辨率 First level scan resolution	70 000
二级扫描范围 Second level scanned area	依赖于一级母离子质荷比自动选择 Autoselection depending on the first parent ion mass-to-charge ratio
二级碰撞能量（NCEs）Second level normalized collision energy	28%
二级扫描分辨率 Second level scan resolution	17 500
毛细管温度 Capillary tube temperature	250℃
离子源电压 Ion source voltage	1 800 V
碎裂模式 Fragmentation mechanism	高能诱导解离 Higher-energy collisional dissociation（HCD）

1.6　细菌蛋白鉴定

利用本地化的 Mascot（Matrix Science）软件将质谱鉴定到的蛋白比对细菌的 Uniprot 蛋白数据库，母离子质量误差设置为 20 mmu，碎片离子误差设为 15 μg/g，半胱氨酸上的脲甲基修饰以及蛋氨酸上氧化修饰分别被选定为固定修饰和可变修饰。允许失误的剪切位点为 1。检索结果以 $P < 0.05$ 为显著。

2　结果

2.1　褐飞虱成虫唾液成分的一维电泳

本研究对浓缩后的褐飞虱成虫唾液细菌蛋白进行了一维电泳（图 1），大多数蛋白分子量分布在 40 ~ 100 kD 之间。

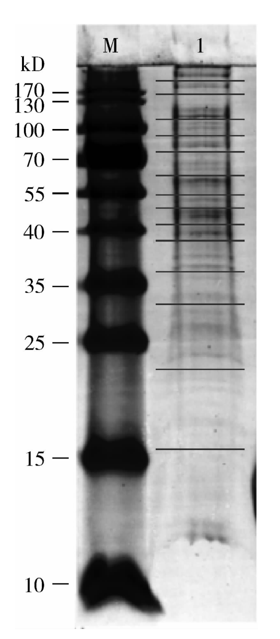


图 1　褐飞虱成虫唾液细菌蛋白的分离电泳

Fig. 1　Electrophoretic separation of bacterial proteins in saliva of *Nilaparvata lugens* adults

M：预染的蛋白质分子量标准 Pre-stained protein ladder；1：褐飞虱唾液蛋白 Salivary proteins of *N. lugens*.

2.2　褐飞虱成虫唾液中细菌蛋白的鉴定

通过液相色谱串联质谱对褐飞虱成虫唾液中细菌蛋白进行鉴定，与 Uniprot 的细菌蛋白数据库进行比对，鉴定出 35 种细菌蛋白（表 2）。参与细菌能量代谢的蛋白种类最多，包括 ATP 合成酶、苹果酸脱氢酶、柠檬酸合成酶、琥珀酰辅酶A连接酶、磷酸烯

表 2　褐飞虱成虫唾液提取物中的细菌蛋白

Table 2　Bacterial proteins isolated from saliva of *Nilaparvata lugens* adults

门 Phylum	纲 Class	目 Order	种 Species	寄主 Host	鉴定的蛋白 Protein identified	GenBank 登录号 GenBank accession no.	肽段数 Number of peptides	分子质量(kD) Molecular weight	Mascot 分值 Mascot score
变形菌门 Proteobacteria	γ-变形菌纲 γ-Proteobacteria	假单胞菌目 Pseudomonadale	鲍氏不动杆菌 *Acinetobacter baumannii*		ATP 合成酶 ATP synthase	B7H296	8	55.4	409.59
					苹果酸脱氢酶 Malate dehydrogenase	B0VQX5	5	35.3	240.77
					50S 核糖体蛋白 50S ribosomal protein	B7GW03	3	21.5	145.90
					外膜蛋白 Outer membrane protein	A3M8K2	2	38.4	119.65
					乙酮醛酸还原异构酶 Ketol-acid reductoisomerase	B7H047	2	36.8	107.99
					ATP 合成酶 ATP synthase	B7H293	2	14.5	79.17
			贝氏不动杆菌 *Acinetobacter baylyi*	褐飞虱 *N. lugens*	延伸因子 Tu Elongation factor Tu	Q6FF97	12	42.9	657.25
					ATP 合成酶 ATP synthase	Q6FFK0	8	50.3	463.23
					苹果酸脱氢酶 Malate dehydrogenase	Q6F7X1	5	35.4	223.95
					核苷二磷酸激酶 Nucleoside diphosphate kinase	Q6FEM7	4	15.4	214.07
					DNA 饥饿保护蛋白 DNA protection during starvation protein	Q6FCX7	2	19.0	124.50
			醋酸钙不动杆菌 *Acinetobacter calcoaceticus*	褐飞虱 *N. lugens*	柠檬酸合成酶 Citrate synthase	P20902	2	47.4	62.78
			荧光假单胞菌 *Pseudomonas fluorescens*		DNA 指导的 RNA 聚合酶 DNA-directed RNA polymerase	C3K2Y3	53	150.9	2 728.00
					甘氨酸脱氢酶 Glycine dehydrogenase	C3JYR1	31	102.2	2 006.40
					ATP 合成酶 ATP synthase	C3K1E6	22	49.5	1 529.71
					转录终止因子 Transcription termination factor	P52155	20	46.9	1 034.61

续表 2 Table 2 continued

门 Phylum	纲 Class	目 Order	种 Species	寄主 Host	鉴定的蛋白 Protein identified	GenBank 登录号 GenBank accession no.	肽段数 Number of peptides	分子质量(kD) Molecular weight	Mascot 分值 Mascot score
			铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa*		琥珀酰辅酶 A 连接酶 Succinyl-CoA ligase	C3K6N0	16	41.3	992.04
					精氨琥珀酸合酶 Argininosuccinate synthase	C3KBZ2	9	45.3	475.22
					磷酸烯醇丙酮酸羧化酶 Phosphoenolpyruvate carboxylase	Q3KHE4	8	97.3	396.42
					腺苷酸激酶 Adenylate kinase	C3KEC6	3	23.3	96.11
					转醛酮酶 Transaldolase	Q3K9H0	2	33.7	111.08
					乌头酸水合酶 Aconitate hydratase	Q9I3F5	8	99.1	575.29
					丙酮酸脱氢酶 Pyruvate dehydrogenase	Q59637	8	99.5	470.80
					细胞分裂蛋白 Cell division protein	P47203	8	44.6	385.86
					谷胱甘肽还原酶 Glutathione reductase	P23189	2	49.2	72.81
					甘油醛-3-磷酸脱氢酶 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	P27726	1	36.1	36.63
			恶臭假单胞菌 *Pseudomonas putida*		伴侣蛋白 Chaperone protein	A6VCL8	5	68.3	280.84
		单胞菌目 Aeromonadales	嗜水气单胞菌 *Aeromonas hydrophila*	褐飞虱 *N. lugens*	延伸因子 G Elongation factor G	A0KQ96	10	77.5	594.01
		肠杆菌目 Enterobacteriales	弗氏柠檬酸杆菌 *Citrobacter freundii*	橙头蟑螂 *Eublaberus posticus*	外膜蛋白 A Outer membrane protein A	P24016	3	25.6	121.48
			克氏柠檬酸杆菌 *Citrobacter koseri*		琥珀酰鸟氨酸转氨酶 Succinylornithine transaminase	A8AHE0	1	43.5	54.74
			阴沟肠杆菌 *Enterobacter cloacae*	褐飞虱 *N. lugens*, 沙漠蝗 *Schistocerca gregaria*	翻译起始因子 Translation initiation factor	Q9ZF25	7	97.8	272.35

续表 2 Table 2 continued

门 Phylum	纲 Class	目 Order	种 Species	寄主 Host	鉴定的蛋白 Protein identified	GenBank 登录号 GenBank accession no.	肽段数 Number of peptides	分子质量(kD) Molecular weight	Mascot 分值 Mascot score
			伤口埃希菌 *Escherichia vulneris*		6-磷酸葡糖脱氢酶 6-Phosphogluconate dehydrogenase	P41583	5	48.8	299.79
			解淀粉欧文氏菌 *Erwinia amylovora*		乙酮醛酸还原异构酶 Ketol-acid reductoisomerase	B2VG69	6	53.9	225.75
			欧文氏杆菌 *Erwinia tasmaniensis*		精氨琥珀酸合成酶 Argininosuccinate synthase	B2VGA8	10	44.7	567.52
					赖氨酸-tRNA 连接酶 Lysine-tRNA ligase	B2VF45	3	57.5	141.78
					延伸因子 Ts Elongation factor Ts	B2VE09	1	30.3	105.43
			Hamiltonella defensa	蚜虫 Aphid，烟粉虱 *Bemisia tabaci*	翻译起始因子 Translation initiation factor	C4K3F0	4	97.3	191.52
			克雷伯氏肺炎菌 *Klebsiella pneumoniae*	沙漠蝗 *Schistocerca gregaria*	DNA 指导的 RNA 聚合酶 DNA-directed RNA polymerase	B5XYF5	18	150.4	687.07
					甘油激酶 Glycerol kinase	A6TFR2	5	56.1	292.74
					双官能团嘌呤生物合成蛋白 Bifunctional purine biosynthesis protein	A6TGR3	4	57.2	228.08
					铁吸收调节蛋白 Ferric uptake regulation protein	P45599	2	17.8	102.96
			粘质沙雷氏菌 *Serratia marcescens*	白背飞虱 *Sogatella furcifera*	60 kD 伴侣蛋白 60 kD chaperonin	O66206	22	56.6	1 213.23
					外膜蛋白 Outer membrane protein	O33980	10	41.2	625.60
					甘油醛-3-磷酸脱氢酶 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	P24166	10	31.4	542.31

续表 2 Table 2 continued

门 Phylum	纲 Class	目 Order	种 Species	寄主 Host	鉴定的蛋白 Protein identified	GenBank 登录号 GenBank accession no.	肽段数 Number of peptides	分子质量(kD) Molecular weight	Mascot 分值 Mascot score
					双官能团天冬氨酸激酶/高丝氨酸脱氢酶 Bifunctional aspartokinase/homoserine dehydrogenase	P27725	5	88.4	200.36
					DNA 饥饿保护蛋白 DNA protection during starvation protein	Q84AP0	3	6.04	137.90
					邻氨基苯甲酸合成酶 Anthranilate synthase	P00897	1	57.6	56.84
			Sodalis glossinidius	采采蝇 *Glossina*	延伸因子 Tu Elongation factor Tu	Q2NQL7	15	43.1	862.92
					30S 核糖体蛋白 30S ribosomal protein	Q2NQP6	4	23.6	209.25
		黄单胞菌目 Xanthomonadales	嗜麦芽寡养单胞菌 *Stenotrophomonas maltophilia*		丝氨酸羟甲基转移酶 Serine hydroxymethyltransferase	B2FNK2	5	45.0	205.89
放线菌门 Actinobacteria	放线菌纲 Actinobacteria	微球菌目 Micrococcales	氯酚节杆菌 *Arthrobacter chlorophenolicus*		DNA 指导的 RNA 聚合酶 DNA-directed RNA polymerase	B8HD15	4	143.7	211.28
			Arthrobacter sp. FB24		乙酸激酶 Acetate kinase	A0JZZ4	1	40.7	28.41
厚壁菌门 Firmicutes	芽孢杆菌纲 Bacilli	芽孢杆菌目 Bacillales	解淀粉芽孢杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens*		延伸因子 Tu Elongation factor Tu	A7Z0N5	5	43.4	241.28
			枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*	斑衣蜡蝉 *Lycorma delicatula*	寡聚-1,6-葡萄糖苷酶 Oligo-1,6-glucosidase	O34364	1	65.8	53.04

醇丙酮酸羧化酶、腺苷酸激酶、转醛酮酶、乌头酸水合酶、丙酮酸脱氢酶、甘油醛-3-磷酸脱氢酶、6-磷酸葡萄糖脱氢酶和寡聚-1,6-葡萄糖苷酶。参与蛋白折叠与合成的有核糖体蛋白、延伸因子、转录终止因子、分子伴侣蛋白、翻译起始因子、赖氨酸-tRNA 连接酶和铁吸收调节蛋白。与氨基酸代谢过程有关的蛋白包括乙酮醛酸还原异构酶、甘氨酸脱氢酶、精氨琥珀酸合酶、琥珀酰鸟氨酸转氨酶、双官能团天冬氨酸激酶/高丝氨酸脱氢酶、邻氨基苯甲酸合成酶、丝氨酸羟甲基转移酶。与核酸代谢相关的有核苷二磷酸激酶、DNA 指导的 RNA 聚合酶和双官能团嘌呤生物合成蛋白。另外,本研究还鉴定到了细菌的细胞骨架蛋白细胞分裂蛋白,参与离子运输的外膜蛋白,与 DNA 修复有关的 DNA 饥饿保护蛋白,维持细胞质内氧化还原平衡的谷胱甘肽还原酶,参与脂代谢的甘油激酶和与乙酰辅酶 A 生物合成有关的乙酸激酶。

这 35 种蛋白来源于 22 种细菌,在门分类阶元上,比对到变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)和厚壁菌门(Firmicutes)。其中蛋白种类鉴定较多的集中在变形菌门,包括 γ-变形菌纲的假单胞菌目(Pseudomonadale)、单胞菌目(Aeromonadales)、肠杆菌目(Enterobacteriales)和黄单胞菌目(Xanthomonadales)。

3 讨论

本研究利用液相色谱-电喷雾串联质谱分析技术,对褐飞虱水状唾液中蛋白进行鉴定,共得到 35 种蛋白,这些蛋白的功能主要是参与能量代谢、氨基酸代谢以及蛋白的合成与折叠。其中,种类最多的是参与细菌能量代谢的蛋白,包括参与糖酵解过程、三羧酸循环、电子传递链、戊糖磷酸途径等代谢过程的多种酶类。昆虫内共生菌与宿主之间的互作关系已成为昆虫学研究的热点之一。褐飞虱通过取食过程中分泌唾液与水稻互作,因而唾液中所含有的细菌蛋白可能参与了这个过程,在褐飞虱取食、致害中发挥作用。褐飞虱是典型的刺吸式口器昆虫,取食水稻韧皮部的汁液,食物来源单一,往往容易缺乏营养(李香香, 2010)。研究发现,所有半翅目昆虫中以韧皮部汁液为食者均有共生微生物,而那些辅助性地专食完整植物细胞的类群则失去了共生菌(Douglas, 1998; 李香香, 2010)。共生菌可以为褐飞虱提供 B 族维生素、氨基酸和固醇等营养物质,如 *Baumannia cicadellinicola* 可以为琉璃叶蝉提供维生素(Wu *et al*., 2006)。而本研究测到的 7 种细菌蛋白乙酮醛酸还原异构酶、甘氨酸脱氢酶、精氨琥珀酸合酶、琥珀酰鸟氨酸转氨酶、双官能团天冬氨酸激酶/高丝氨酸脱氢酶、邻氨基苯甲酸合成酶、丝氨酸羟甲基转移酶都参与了氨基酸的合成与代谢,可能是由于褐飞虱体内的共生菌为其生长发育提供氨基酸的过程中分泌出来的。另外,乙酸激酶参与乙酰辅酶 A 的合成,而乙酰辅酶 A 是胆固醇合成的原料。共生菌还可以分泌抗菌肽、毒素等以增强对外源寄生物等的防御能力(范海伟, 2015),本实验鉴定到的与蛋白合成、折叠有关的蛋白可能参与了这个过程。

这些蛋白来自于 22 种细菌微生物。其中有 4 种细菌在褐飞虱体内已有报道,分别是贝氏不动杆菌 *Acinetobacter baylyi*, 醋酸钙不动杆菌 *Acinetobacter calcoaceticus*, 嗜水气单胞菌 *Aeromonas hydrophila* 和阴沟肠杆菌 *Enterobacter cloacae* (李香香, 2010; Tang *et al*., 2010; 李香香等, 2011; 唐明等, 2014)。唐明等(2014)收集了褐飞虱水溶性唾液分泌物,通过建立 16S rDNA 文库检测到了 6 种细菌,其中有 1 种就是贝氏不动杆菌 *A. baylyi*。李香香从褐飞虱肠道中鉴定到醋酸钙不动杆菌 *A. calcoaceticus*(李香香等, 2011)和阴沟肠杆菌 *E. cloacae*(李香香, 2010)。Tang 等(2010)在褐飞虱敏感种群和抗性种群(含抗性基因 *bph*2)中检测到嗜水气单胞菌 *A. hydrophila*。其他许多种、属的细菌也曾在昆虫中有所报道。*Hamiltonella defense* 是蚜虫和烟粉虱的次生共生菌。当蚜虫感染 *H. defensa* 后,寄生蜂寄生率显著降低,表明感染了这种次生内共生菌可能为蚜虫提供了抵抗寄生蜂攻击的能力(张焱等, 2016)。粘质沙雷氏菌 *Serratia marcescens* 是许多昆虫体内的一种病原细菌,唐小影曾在白背飞虱的体内检测到(康小影, 2014)。*Sodalis glossinidius* 是采采蝇的共生细菌(康小影, 2014; 范海伟, 2015)。Cruden 和 Markovetz (1984)研究了橙头蟑螂 *Eublaberus posticus* 的肠道细菌,发现弗氏柠檬酸杆菌 *Citrobacter freundii* 是其最主要的细菌类群之一。Dillon 等(2002)从蝗虫肠道中分离出了阴沟肠杆菌 *Enterobacter cloacae*、克雷伯氏肺炎菌 *Klebsiella pneumoniae* 和条件致病菌粘质沙雷氏菌 *S. marcescens*。阴沟肠杆菌 *E. cloacae* 和克雷伯氏肺炎菌 *K. pneumoniae* 能产生愈创木酚,这种物质是蝗虫聚集信息素的成分之一。假单胞菌属

Pseudomonas 是一类专性好氧的革兰氏阴性杆菌，在自然界分布广泛，在水体、土壤、植物组织和动物体内都有发现。有研究发现一些假单胞菌属细菌具有纤维素降解活性，并且它可以通过糖酵解和戊糖磷酸化途径降解碳水化合物，所以假单胞菌可能参与了为寄主提供能量的过程（王娇莉，2016）。该属包含许多致病菌，其中铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa*、荧光假单胞菌 *Pseudomonas fluorescens* 是昆虫的潜在病原菌。Kellner 发现隐翅虫体内的内共生菌是铜绿假单胞菌 *P. aeruginosa*，它能产生聚酮类毒隐翅虫素，这种毒素不能改变昆虫天敌的行为，但有效阻止了狼蛛 *Lycosa* 的捕食，从而降低被捕食的概率（Kellner，2003）。张瑛（2015）也在斑透翅蝉的唾液腺中鉴定出了铜绿假单胞菌 *P. aeruginosa*，且该菌与肠杆菌 *Enterobacter* sp. 为优势细菌。李香香（2010）从白背飞虱和褐飞虱肠道中鉴定到 19 个属，其中不动杆菌属 *Acinetobacter*、*Stenotrophomonas*、芽孢杆菌属 *Bacillus*、肠杆菌属 *Enterobacter* 和欧文氏菌属 *Erwinia* 6 个属在本实验中均有鉴定到相应的蛋白。Tang 等（2010）在褐飞虱抗性种群（具有抗性基因 *bph2*）中鉴定出了节杆菌属 *Arthrobacter* 的细菌，本研究也同样鉴定出两种节杆菌属细菌的蛋白。刘玉升等（2007）在东亚飞蝗肠道中分离出 16 个细菌菌株，分属于 16 个属，其中沙雷氏菌属 *Serratia*、肠杆菌属 *Enterobacter*、柠檬酸杆菌属 *Citrobacter*、不动杆菌属 *Acinetobacter* 和克雷伯菌属 *Klebsiella* 中鉴定到的蛋白在褐飞虱唾液中均有鉴定到。刘玉升（2006）分离鉴定了斑衣蜡蝉消化道内的 4 种细菌，均为兼性厌氧芽孢杆菌，其中，枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 的蛋白也在褐飞虱唾液中存在，研究表明，芽孢杆菌 *Bacillus* 对较为恶劣的环境条件适应有关。

本研究鉴定出了许多种已报道过的褐飞虱共生细菌及其他昆虫共生菌的蛋白，这些细菌蛋白可能来源于褐飞虱唾液中的细菌群落，肠道细菌代谢的蛋白，水稻等寄主植物的内生细菌蛋白，褐飞虱含菌胞内的蛋白等，这些细菌及其分泌的蛋白可能在褐飞虱的生活史中发挥了重要的作用。但是，在褐飞虱内已明确的内共生菌 *Wolbachia* 和杀雄菌属 *Arsenophonus* 的细菌蛋白均未在褐飞虱唾液中鉴定到，可能该共生菌不会随唾液分泌出来。关于褐飞虱、其唾液细菌蛋白以及水稻三者之间的关系将是进一步研究的问题。

参考文献（References）

Brumin M, Levy M, Ghanim M, 2012. Transovarial transmission of *Rickettsia* spp. and organ-specific infection of the whitefly *Bemisia tabaci*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 78(16): 5565–5574.

Cruden DL, Markovetz AJ, 1984. Microbial aspects of the cockroach hindgut. *Arch. Microbiol.*, 138: 131–139.

Dillon RJ, Vennard CT, Charnley AK, 2002. A note: gut bacteria produce components of a locust cohesion pheromone. *J. Appl. Microbiol.*, 92: 759–763.

Douglas AE, 1998. Nutritional interactions in insect-microbial symbioses: aphids and their symbiotic bacteria *Buchnera*. *Annu. Rev. Entomol.*, 43: 17–37.

Fan HW, 2015. The Genomic Analysis Reveals the Symbiotic Relationship Between Brown Planthopper and Its Endosvmbionts. PhD Dissertation, Zhejiang University, Hangzhou. [范海伟, 2015. 基因组学分析揭示褐飞虱与体内共生微生物的共生关系. 杭州: 浙江大学博士学位论文]

Kang XY, 2014. Bacterial Diversity in Whitebacked Planthopper and Its Relationship with the Acquisition of Southern Rice Black-streaked Dwarf Virus. MSc Thesis, Zhejiang University, Hangzhou. [康小影, 2014. 白背飞虱体内细菌多样性及其与携带南方水稻黑条矮缩病毒能力的关系研究. 杭州: 浙江大学硕士学位论文]

Kellner RLL, 2003. Stadium-specific transmission of endosymbionts needed for pederin biosynthesis in three species of *Paederus* rove beetles. *Entomol. Exp. Appl.*, 107: 115–124.

Li XX, 2010. Analysis of Gut Bacteria Diversity from Rice Planthoppers. MSc Thesis, Nanjing Agricultural University, Nanjing. [李香香, 2010. 稻飞虱肠道细菌多样性分析. 南京: 南京农业大学硕士学位论文]

Li XX, Yang H, Wang ZW, Su JY, 2011. Analysis of gut bacteria diversity from brown planthopper. *Jiangsu Agric. Sci.*, (1): 126–129. [李香香, 杨焊, 王志伟, 苏建亚, 2011. 褐飞虱肠道细菌多样性分析. 江苏农业科学, (1): 126–129]

Liu YS, Chen YX, Lü F, He H, 2006. Study on the primary identification of intestinal bacteria. *J. Shangdong Agric. Univ. (Nat. Sci.)*, 37(4): 495–498. [刘玉升, 陈艳霞, 吕飞, 何华, 2006. 斑衣蜡蝉成虫肠道细菌的鉴定研究. 山东农业大学学报(自然科学版), 37(4): 495–498]

Liu YS, Li ML, Liu JZ, Zheng JF, 2007. Study on the intestinal bacteria of *L. migratoria manilensis*. *Chin. J. Microecol.*, 19(1): 34–37. [刘玉升, 李明立, 刘俊展, 郑继法, 2007. 东亚飞蝗肠道细菌的研究. 中国微生态学杂志, 19(1): 34–37]

Sharma A, Khan AN, Subrahmanyam S, Raman A, Taylor GS, Fletcher MJ, 2014. Salivary proteins of plant-feeding hemipteroids – implication in phytophagy. *Bull. Entomol. Res.*, 104: 117–136.

Sogawa K, 1982. The rice brown planthopper: feeding physiology and host plant interactions. *Annu. Rev. Entomol.*, 27: 49–73.

Tan ZJ, Xiao QM, Xie BY, Yang YH, Feng LX, 2005. A review on endosymbionts in insects. *Microbiol. China*, 32(4): 140–143. [谭周进, 肖启明, 谢丙炎, 杨宇红, 冯兰香, 2005. 昆虫内共

生菌研究概况. 微生物学通报, 32(4): 140 – 143]

Tang M, Lv L, Jing SL, Zhu LL, He GC, 2010. Bacterial symbionts of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae). *Appl. Environ. Microbiol.*, 76(6): 1740 – 1745.

Tang M, Xu XR, Hong K, Yi Y, 2014. Preliminary analysis of saliva secretion diversity in brown planthopper. *Jiangsu Agric. Sci.*, 42(2): 90 – 92. [唐明, 徐小蓉, 洪鲲, 乙引, 2014. 褐飞虱唾液分泌物中细菌多样性的初步分析. 江苏农业科学, 42(2): 90 – 92]

Wang GC, 2005. The Nutritional Function and Its Molecular Basis of Yeast Like Symbiotes in Rice Brown Planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stål). PhD Dissertation, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing. [王国超, 2005. 褐飞虱体内类酵母共生菌的营养功能及其分子基础的研究. 北京: 中国农业科学院博士学位论文]

Wang JL, 2016. Composition and Diversity of Intestinal Bacterial from *Atrijuglans hetaohei* and *Dichocrocis punctiferalis* Larvae. MSc Thesis, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi. [王娇莉, 2016. 核桃举肢蛾 *Atrijuglans hetaohei* 和桃蛀螟 *Dichocrocis punctiferalis* 幼虫肠道细菌组成及多样性研究. 陕西杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文]

Wang WX, Luo J, Lai FX, Fu Q, 2010. Identification and phylogenetic analysis of symbiotic bacteria *Arsenophonus* from the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae). *Acta Entomol. Sin.*, 53(6): 647 – 654. [王渭霞, 罗举, 赖凤香, 傅强, 2010. 水稻褐飞虱内生共生细菌 *Arsenophonus* 的鉴定和系统分析. 昆虫学报, 53(6): 647 – 654]

Wu D, Daugherty S, Van Aken S, Pai G, Watkins KH, Tallon L, Zaborsky J, Dunbar H, Tran P, 2006. Metabolic complementarity and genomics of the dual bacterial symbiosis of sharpshooters. *PLoS Biol.*, 4(6): 1079 – 1092.

Yang YT, Guo JY, Long CY, Liu H, Wan FH, 2014. Advances in endosymbionts and their functions in insects. *Acta Entomol. Sin.*, 57(1): 111 – 122. [杨义婷, 郭建洋, 龙楚云, 刘怀, 万方浩, 2014. 昆虫内共生菌及其功能研究进展. 昆虫学报, 57(1): 111 – 122]

Zhang Y, Nan XN, He H, Wei Z, 2015. Bacteria associated with salivary glands of cicada *Hyalessa maculaticollis* (Motschulsky) (Hemiptera: Cicadidae). *J. Microbiol. China*, 42(3): 516 – 524. [张瑛, 南小宁, 贺虹, 魏琮, 2015. 斑透翅蝉唾液腺细菌群落组成研究. 微生物学通报, 42(3): 516 – 524]

Zhang Y, Zhang YB, Zhang J, Guo JY, Guo JY, Liu H, Wan FH, 2016. Advances of the secondary endosymbionts in sap-feeding insects. *J. Biosafety*, 25(2): 92 – 98, 122. [张焱, 张毅波, 张婧, 郭建洋, 郭建英, 刘怀, 万方浩, 2016. 刺吸式昆虫次生内共生菌的研究进展. 生物安全学报, 25(2): 92 – 98, 122]

(责任编辑: 马丽萍)